

FABÍOLA CAVASSIN

EFEITO DO ESTRESSE SALINO SOBRE A  
ULTRA-ESTRUTURA BRANQUIAL DO CAMARÃO  
DE ÁGUA DOCE DA FAMÍLIA PALAEMONIDAE  
*Macrobrachium acanthurus* (DECAPODA).

Projeto de monografia submetido ao  
Departamento de Fisiologia do Setor  
de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná,  
como requisito parcial à obtenção do  
título de Bacharel em Ciências  
Biológicas. Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Carolina Arruda de Oliveira Freire.

CURITIBA  
1999

*“Somos seres preocupados em agir, fazer, resolver, providenciar. Estamos sempre tentando planejar uma coisa, concluir outra, descobrir uma terceira. Não há nada de errado nisto – afinal de contas, é assim que construímos e modificamos o mundo.*

*Mas faz parte da experiência da vida o ato de adoração. Parar de vez em quando, sair de si mesmo, permanecer em silêncio, dar um tempo ao tempo, não pensar em nada, apenas em você mesmo.*

*Nestes momentos, algumas lágrimas inesperadas – que não são de alegria, nem de tristeza – podem jorrar. Não se surpreenda. Isto é um Dom. Estas lágrimas estão lavando a sua alma.”*

- Paulo Coelho

*Aos meus pais Adir e Maria Estela Cavassin, pela dedicação, pelo carinho e pela inesgotável paciência que foram essenciais para a realização deste trabalho. A vocês, o meu muitíssimo obrigada!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Arruda Freire que não se contentou em ser apenas professora, mas também foi uma grande amiga durante esses anos de convivência. Durante todo este tempo sempre teve muita força de vontade em ensinar e em ajudar, mostrando ser muito paciente e muito otimista mesmo nos momentos mais difíceis (que nós sabemos que não foram poucos).

Muito obrigada ao professor Henry L. Spach do Centro de Estudos do Mar, pela disposição e boa vontade em ajudar na coleta dos camarões.

Agradeço ao professor e chefe do Departamento de Fisiologia Luiz Cláudio Fernandes por permitir o uso do espectofotômetro. Obrigada também aos demais integrantes do Laboratório de Metabolismo Intermediário.

Obrigada ao professor Ciro Alberto O. Ribeiro do Departamento de Biologia Celular que ajudou com a preparação do material no Ultramicrotomo e pelo empréstimo de materiais.

Agradeço a professora Daura Regina Eiras-Stofella do Centro de Microscopia Eletrônica, por me auxiliar no uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão. Agradeço também a técnica Matilde Machado de Oliveira, pela confecção dos cortes grossos e finos, e a técnica Vera Regina Fontana Pionteke por revelar os negativos e por fazer as ampliações o mais rápido possível.

Muito abrigada a professora Sônia Grötzner do Departamento de Biologia Celular, pela boa vontade em ajudar dispondo de tempo e paciência durante o uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão.

O meu sincero muito obrigada a minha amiga Ellen N. Rodrigues pela adorável companhia durante todos estes anos no Laboratório de

Fisiologia Comparativa, pela ajuda, pelos incentivos de ânimo, pelo ombro amigo, pela paciência em escutar as minhas lamúrias e lamentações e pelas inesquecíveis cervejinhas acompanhadas de boas risadas no final da tarde, mesmo quando tudo parecia estar perdido. Agradeço também a Viviane Prodócimo que vivenciou as minhas conquistas e derrotas durante a confecção deste trabalho e que sempre tinha uma boa risada para me animar.

Agradeço a Deus pela existência dos meus sobrinhos Gianfranco e Lorenzo, que de uma forma ou outra conseguiam fazer desaparecer em mim o desânimo e mau humor após horas em que estive literalmente “plantada” na frente do computador.

Muito obrigada a todos aqueles que participaram indiretamente deste trabalho simplesmente acreditando em mim durante todos esses anos: Fabiano e Eliane Daroit Cavassin, Anderson Cavassin, Camilla Cavassin e vovó Romualda.

## ÍNDICE

### RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1 Coleta.....	9
3.2 Experimentos de aclimação (0‰ e 28‰).....	9
3.3 Determinação da concentração de cloreto da hemolinfa .....	10
3.4 Micro-anatomia e ultra-estrutura das lamelas branquias...	11
3.5 Análise morfométrica do septo intralamelar.....	13
3.6 Análise morfométrica dos microvilos apicais.....	14
4. RESULTADOS.....	16
4.1 Ultra-estrutura da lamela branquial.....	16
4.1.1 Aspecto morfológico e ultra-estrutural das brânquias de <i>M. acanthurus</i> aclimatado em água doce (0 ‰).....	16
4.1.2 Aspecto morfológico e ultra-estrutural das brânquias de <i>M. acanthurus</i> aclimatado em água do mar diluída (28 ‰).....	17
4.2 Análise morfométrica do septo intralamelar e dos microvilos apicais nas lamelas branquias dos camarões controles (0 ‰) e experimentais (28 ‰).....	18
4.2.1 Densidade de área de dobramentos de membrana e volume mitocondrial.....	18
4.2.2 Densidade e altura dos microvilos apicais.....	18
5. DISCUSSÃO.....	20

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
------------------------------------	----

PRANCHAS.....	31
---------------	----

## 1. INTRODUÇÃO

A Família Palaemonidae reúne espécies que ocupam uma variedade de ambientes aquáticos. A grande maioria habita o ambiente dulcícola (0 ‰), alguns são marinhos (35 ‰), e outros habitam águas estuarinas (5 a 30 ‰). Estes três tipos de ambientes oferecem estresses salinos bem distintos, devido à grande variação de salinidade existente entre eles. Esta diferença de salinidade, por sua vez, implica na necessidade de adaptações fisiológicas específicas para os crustáceos que habitam estes ambientes.

Muitas vezes os camarões não passam por todo o seu ciclo de vida em um único tipo de ambiente salino. Dentro do mesmo gênero são encontradas espécies com diferentes graus de dependência da água do mar. O gênero *Macrobrachium*, por exemplo, apresenta espécies como *M. acanthurus* e *M. olfersii*, que dependem da água do mar para realizar seus processos de reprodução e metamorfose (McNamara, 1987), o mesmo ocorrendo para *M. rosenbergii* em relação à água salobra (Funge-Smith *et al.*, 1995). Por outro lado, *M. potiuna* e *M. iheringi* são espécies hololimnéticas, e apresentam um comportamento diferente, ou seja: são inteiramente dulcícolas e não dependem da água salgada para completar o seu desenvolvimento (Moreira *et al.*, 1983).

A salinidade é um fator ambiental limitante que merece considerável atenção no que diz respeito aos efeitos que provoca sobre a reprodução e desenvolvimento dos animais de ambientes onde este fator está sujeito a variações (Pequéux, 1995). À medida em que a salinidade do meio se altera a tendência é de que a osmolalidade da hemolinfa acompanhe esta alteração, de modo que se estabeleça um equilíbrio entre a concentração de osmólitos do meio interno com o meio externo. Variações na salinidade do meio provocam um desajuste no balanço osmótico destes animais, e estes utilizam-se de mecanismos



regulatórios a fim de controlar o volume e a osmolalidade do fluido extracelular (Pequéux, 1995 e Chen *et al.*, 1997).

A classe Crustacea mostra uma grande capacidade de regular a concentração iônica extra-celular, devido a sua história evolutiva nos ambientes aquáticos diluídos. Por este motivo, grande parte dos crustáceos desenvolveram mecanismos osmorregulatórios com a finalidade de promover a homeostase interna. Alguns grupos de crustáceos mantêm as concentrações da hemolinfa isosmóticas com o ambiente marinho (espécies exclusivamente marinhas), enquanto outros grupos regulam a concentração sangüínea hipo-osmoticamente, hiper- osmoticamente ou hipo- e hiper-osmoticamente em relação aos seus ambientes: marinho, de água-doce ou estuarino (Lucu, 1993).

A ativação dos mecanismos regulatórios depende do período de tempo em que o animal é submetido às diferentes salinidades, e da capacidade de regulação anisomótica extracelular nestas condições específicas (Freire e McNamara, 1995). A capacidade de regulação anisomótica extracelular representa a capacidade intrínseca de cada animal em manter a composição dos fluidos extracelulares mais ou menos constantes e diferentes do meio externo, visando preservar as células e os tecidos internos das drásticas mudanças de salinidade do meio externo.

Estudos realizados dentro da Família Palaemonidae sobre a regulação osmótica e iônica, mostram que algumas espécies como *M. rosenbergii* e em outras espécies do gênero *Macrobrachium*, exibem um considerável poder sobre a regulação osmótica do seu líquido extracelular, mantendo-a aproximadamente constante quando transferidos da água-doce para meios de salinidades elevadas experimentais (Moreira *et al.*, 1983; McNamara, 1987 e Funge-Smith *et al.*, 1995). Basicamente existem dois mecanismos envolvidos na

manutenção da homeostase do líquido extracelular: (1) limitação da permeabilidade dos epitélios de interface a fim de minimizar os movimentos de difusão de íons (em especial pelo epitélio branquial), e (2) movimentação ativa de NaCl a fim de contrapor os fluxos passivos deste sal devido aos gradientes de concentração (Péqueux, 1995). Alguns estudos revelam que extratos de tecidos neuro-endócrinos como o gânglio supra-esofágico e o gânglio óptico interferem sobre a regulação extracelular, sugerindo a participação de um controle neuro-endócrino sobre estes mecanismos atuantes (Souza *et al.*, 1994; Freire e McNamara, 1992; Freire *et al.*, 1995 e Péqueux, 1995).

As brânquias são a principal área de trocas gasosas entre o animal e seu ambiente, e o principal órgão capaz de manter constante as concentrações osmóticas do fluido extra- e intracelular, frente às variações de salinidade do meio externo. As brânquias são responsáveis por realizar as trocas de gases respiratórios, são também permeáveis a água e íons, sendo o principal local de fluxos difusivos e realizam o transporte ativo dos íons envolvidos na osmorregulação do fluido extracelular (Kikuchi *et al.*, 1993 e Péqueux, 1995). A primeira evidência de que o epitélio branquial era responsável pelo transporte de íons foi obtida por Koch e seus colaboradores em 1954, usando brânquias isoladas (e não perfundidas) do caranguejo chinês *Eriocheir sinensis*. A partir destes resultados outros estudos revelaram claramente que a regulação osmótica e iônica nas espécies hiper- e hipo-reguladoras de crustáceos são realizadas principalmente pelas brânquias (Péqueux, 1995). Lawson e colaboradores (1994) afirmam que as brânquias dos crustáceos além de serem responsáveis por todos os mecanismos acima citados, ainda participam da regulação de ácidos e bases e atuam na excreção de amônia. Estas conclusões baseiam-se em estudos fisiológicos, bioquímicos e de morfologia e ultra-estrutura realizados com inúmeros crustáceos como: *Artemia salina*, *Gecarcinus lateralis*, *Callinectes sapidus*, *Callinectes similis*, *Eriocheir sinensis*, *Uca*

*uruguayensis*, *Carcinus maenas*, bem como em anfípodos, isópodos, sincarídeos e alguns tanaidáceos como *Sinelobus stanfordi* (Kikuchi *et al.*, 1993; Lawson *et al.*, 1994; Pequéux, 1995; Piller *et al.*, 1995; Kikuchi *et al.*, 1997 e Luquet *et al.*, 1997).

Nos camarões da Família Palaemonidae as brânquias se encontram protegidas pelo branquiostergito e são formadas por sete pares de lamelas branquiais do tipo filobrânquia (Fig 1A). Cada lamela branquial é composta por uma dupla série de hemilamelas que estão unidas por um eixo central (Fig 1B). A porção basal de cada lamela branquial é penetrada por três vasos sanguíneos; um vaso aferente central (vc) e dois vasos eferentes laterais (vl). Seccionando transversalmente uma lamela branquial, como mostra a Figura 1C, é possível observar uma cutícula fina (c) delimitando toda a região branquial e, abaixo desta, um conjunto de microvilos pertencentes às células pilares (cp) e seus prolongamentos denominados flanges apicais (fl). As flanges apicais adjacentes se unem através de junções septadas, desmossomos e junções do tipo GAP, estas últimas menos freqüentes. O espaço por onde passa a hemolinfa (he) se encontra abaixo das flanges apicais, ao lado das células pilares. Logo abaixo das células pilares estão as células do septo que divide a lamela em dois compartimentos iguais (cs). Na região do septo encontram-se inúmeros dobramentos de membrana, freqüentemente associados às mitocôndrias.

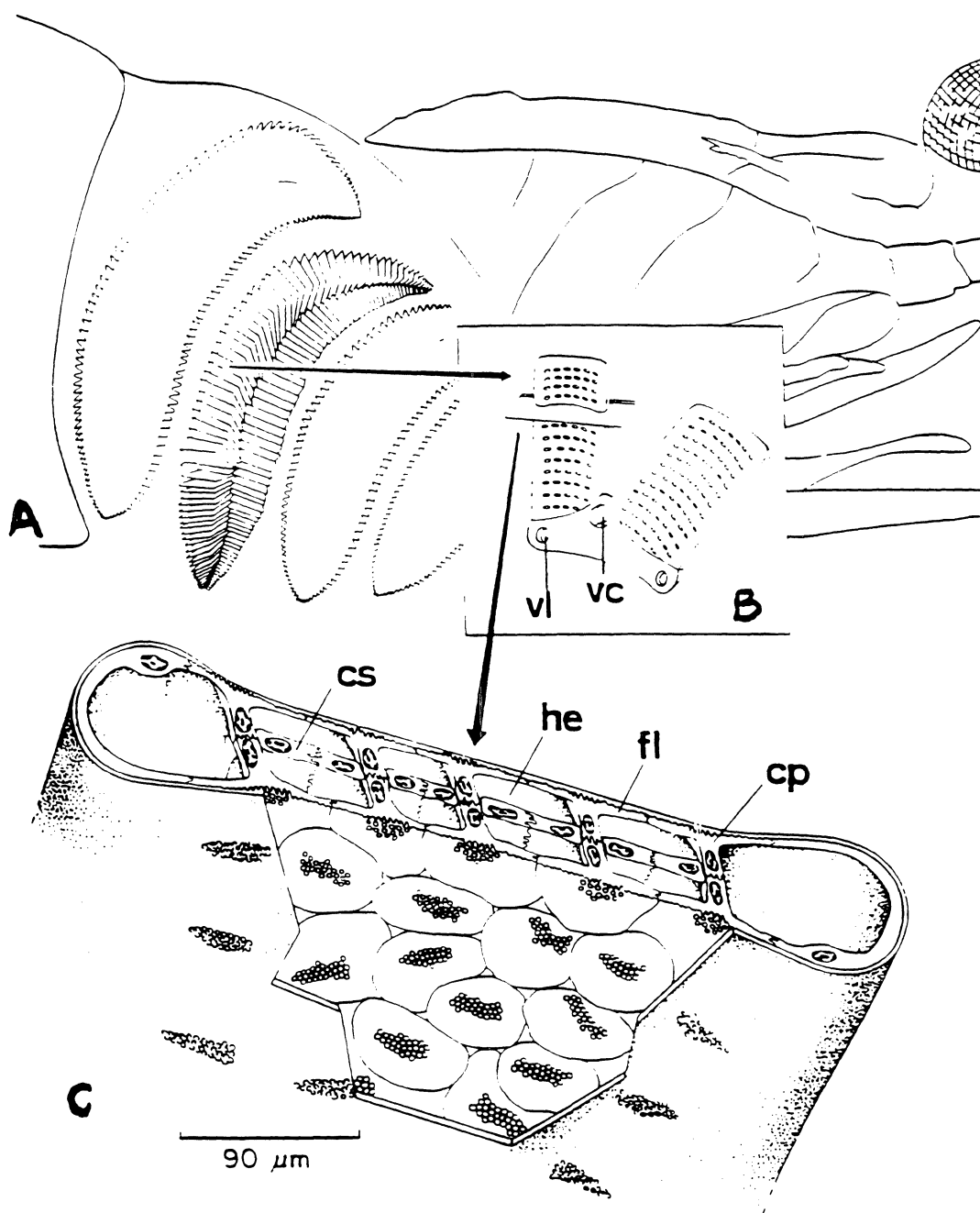


Figura 1 – Figura retirada de Freire & McNamara (1995). A – Representação esquemática da disposição das brânquias em *Macrobrachium olfersii*. B – Corte transversal ao plano da lamela branquial. Observa-se um vaso aferente central (vc) e dois vasos eferentes laterais (vl) na porção basal da lamela. C – Representação tri-dimensional da secção transversal ao longo da lamela branquial mostrando: fina cutícula que envolve toda a região branquial (c), as células pilares (cp) e suas flanges apicais (fl), os espaços de hemolinfa (he) e dividindo a lamela em dois compartimentos iguais estão as células do septo (cs).

Estudos realizados com a espécie *Macrobrachium olfersii* por McNamara e Lima (1997) mostraram sítios de atividade ATPásica ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase) sensível a ouabaina na membrana dos dobramentos das células do septo. A presença destas enzimas na membrana dos dobramentos, juntamente com as mitocôndrias, e a ausência de dobramentos basolaterais nas finas regiões das flanges apicais das células pilares que estão em contato com a hemolinfa são características típicas do transporte ativo de sais, e de trocas gasosas com o meio externo, respectivamente, nas brânquias dos palemonídeos. Em contraste, em branquiúros como *Carcinus maenas*, os mecanismos de transporte de sais, e de trocas gasosas localizam-se nas brânquias posterior e anterior, respectivamente. As brânquias anteriores apresentam epitélio delgado, enquanto brânquias posteriores apresentam regiões de epitélio bem espesso e com rico desenvolvimento de microvilos apicais e dobramentos basolaterais associados a mitocôndrias. Esta estrutura das brânquias posteriores é típica de epitélios transportadores de sais (Barra *et al.*, 1983; Compère *et al.*, 1989 e Péqueux, 1995).

Existem diversas evidências de modificações ultra-estruturais nas brânquias dos animais expostos a condições estressantes de salinidade. McNamara e Lima (1997) e Freire e McNamara (1995), ao estudarem o camarão de água doce *Macrobrachium olfersii*, observaram que estas modificações compreenderam reduções significativas na espessura das flanges das células pilares e na altura e densidade dos microvilos apicais nos animais aclimatados a altas salinidades (21 e 28 ‰), quando comparados com os animais mantidos em água doce. A aclimação a meios de altas salinidades também resultou em configurações alteradas nas membranas plasmáticas dos dobramentos que envolvem as mitocôndrias das células do septo intralamelar, mas não houve diferenças significativas no volume mitocondrial destas mesmas células (Freire e McNamara, 1995). Da mesma maneira,

Pequéux (1995) afirma que a aclimação de diversos crustáceos a meios com alta concentração de sal resulta de forma geral em uma regressão considerável do sistema de dobramentos apicais do epitélio de transporte iônico, seguida de uma diminuição na área da superfície apical destas células e do espaço extra-celular subcuticular. A intensidade destas modificações depende da espécie estudada, da salinidade e do tempo de exposição.

Levando em consideração as informações acima citadas, torna-se interessante avaliar o padrão de resposta epitélio branquial do camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus*, comparando-o com o de outras espécies da mesma família mas que habitam ambientes salinos distintos: *Macrobrachium potiuna*, espécie de água-doce (hololimnética) e *Palaemon pandaliformis*, espécie estuarina (Cavassin e Freire, dados não publicados), e *Macrobrachium olfersii* (Freire *et al.*, 1995 e McNamara *et al.*, 1997)

Através deste enfoque comparativo, será possível avaliar melhor de que maneira a morfologia ultra-estrutural da brânquia reflete os processos de osmorregulação nos camarões da família Palaemonidae. Cabe ressaltar que são poucos os estudos direcionados à esta família em particular, com exceção dos estudos realizados por Freire e McNamara (1995), McNamara e Lima (1997), McNamara e Torres (1999). Os dados obtidos certamente irão contribuir para a compreensão das relações estrutura/ função do tecido osmorregulatório branquial de crustáceos decápodos em geral.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Contribuir para o estudo morfológico e ultra-estrutural das brânquias dos crustáceos palemonídeos.

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- ✓ Verificar o efeito do estresse salino (10 dias em meio hipersalino, 28 ‰) sobre a ultra-estrutura da brânquia no camarão da Família Palaemonidae: *Macrobrachium acanthurus*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA

Espécimes adultos de *Macrobrachium acanthurus* (6 a 10 cm de comprimento) foram coletados em um rio de água doce, próximo ao estuário, por pescadores locais de Pontal do Paraná. No procedimento de coleta, os camarões foram capturados próximo à margem do rio, utilizando-se peneiras ou puçás contendo iscas (pedaços de carne de peixe). Após a coleta os animais foram colocados em diferentes aquários de vidro com capacidade de 30 litros, com a água do local de coleta (água-doce, salinidade 0 ‰), onde permaneceram com aeração ininterrupta e temperatura em torno de 20°C. Os animais foram alimentados com carne vermelha, carne de peixe ou cenoura, em dias alternados.

#### 3.2 EXPERIMENTOS DE ACLIMATAÇÃO (0‰ E 28‰)

Aproximadamente 5 a 7 indivíduos da espécie *Macrobrachium acanthurus* foram mantidos na sua própria água de origem (0 ‰). Esses indivíduos foram utilizados como controles. Em um outro aquário, o mesmo número de animais foi mantido em água do mar diluída a 28 ‰ por 10 dias. Este meio é considerado como sendo um ambiente estressante pelo longo tempo de exposição a uma salinidade elevada para a referida espécie. Estes indivíduos fazem parte do grupo de animais experimentais, cuja ultra-estrutura das brânquias será comparada com a ultra-estrutura das brânquias dos animais controles.

A água experimental foi preparada com uma mistura proporcional de água do mar de Pontal do Paraná (30-35 ‰), com a água doce (0 ‰) do rio Santa Maria localizado nas proximidades do km 3 da estrada Alexandra-Matinhos (rio não poluído). Os valores de



salinidade foram verificados por meio de um refratômetro-salinômetro Shibuya Optical. Todos os procedimentos experimentais acima citados foram realizados no laboratório de Fisiologia Comparativa do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DA HEMOLINFA

Para o preparo de soluções fixadoras fez-se necessária a determinação da concentração de cloreto na hemolinfa dos animais controles (0 ‰) e experimentais (28 ‰ a 10 dias), para se evitar houvesse estresse osmótico para as células das brânquias durante o processo de fixação.

A concentração de cloreto da hemolinfa de *M. acanthurus* em água doce e em água 28 ‰ foi determinada por método colorimétrico. As amostras de hemolinfa diluída (1:5) foram dosadas quanto a sua concentração iônica de cloreto, utilizando-se do Kit Labtest® (Cat. 49). Este kit tem como finalidade a determinação colorimétrica de cloretos. É um sistema utilizado para uso diagnóstico *in vitro* de qualquer fluido biológico e é composto por três tipos de reagentes:

- ✓ Reagente de cor: Contém tiocianato de mercúrio 2 mmol/L, nitrato férrico 17 mmol/L e ácido nítrico 30 mmol/L.
- ✓ Ativador: Contém nitrato de mercúrio 1,1 mmol/L e ácido nítrico 0,9 mmol/L.
- ✓ Padrão: Contém 100 mEq/L de cloreto.

A leitura de absorbância das amostras e do padrão foram feitas no espectrofotômetro Ultrospec 2000 Pharmacia® (comprimento de onda 470 nm) do laboratório de Metabolismo Intermediário do Departamento

de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. A concentração de cloreto encontrada na hemolinfa dos animais controles foi aproximadamente de 100 mEq/L, enquanto que nos animais experimentais a concentração de cloreto foi de 300 mEq/L.

### 3.4 MICRO-ANATOMIA E ULTRA-ESTRUTURA DAS LAMELAS BRANQUIAIS

Para iniciar a fixação, os animais usados como controle e experimentais foram perfundidos com o fixador primário cuja composição está relatada abaixo na Tabela I.

TABELA I – RELAÇÃO DOS COMPONENTES UTILIZADOS NA FIXAÇÃO PRIMÁRIA E PÓS-FIXAÇÃO NOS ANIMAIS CONTROLES (0 ‰) E EXPERIMENTAIS (28 ‰)

Saís	Controle (0 ‰)		Experimental (28 ‰)	
	Pré fixador e lavagem	Pós fixador	Pré fixador e lavagem	Pós fixador
	[ ] mM*	[ ] Mm*	[ ] mM*	[ ] mM*
NaCl	30	30	180	180
KCl	8	8	8	8
CaCl <sub>2</sub>	25	25	25	25
MgCl <sub>2</sub>	4	4	4	4
Cacod-Na**	100	150	100	150

Obs: \* refere-se a concentração final esperada. \*\* Cacodilato de sódio

As soluções de fixação primária utilizadas em ambos os grupos (controle e experimental) ainda consistia de glutaraldeído 2,5 % e paraformaldeído (0,2 M). Como pode-se observar na Tabela I, somente a concentração de NaCl foi variável nos dois grupos de animais devido às diferenças encontradas quanto a osmolalidade (estimadas pelas concentrações de cloreto) da hemolinfa da espécie em ambas as situações (0 ‰, 100 mEq/L; 28 ‰, 300 mEq/L). O pH das soluções de

fixação primária e lavagem foi ajustado em 7,5 para os controles e experimentais.

A solução de fixação primária foi injetada ventralmente dentro do último segmento abdominal por um período de aproximadamente 1 minuto após a corda ventral ter sido seccionada, os pedúnculos oculares e o rostro removidos, para permitir a livre circulação da solução fixadora pelo sistema circulatório.

Após a perfusão, a penúltima brânquia da câmara branquial esquerda foi retirada e dividida em 3 porções de 5-10 lamelas cada, sendo a porção mediana da brânquia fixada por imersão no mesmo fixador primário (contendo glutaraldeído e paraformaldeído) em gelo por 2-3 horas. Os fragmentos de brânquias foram lavados em uma solução com os sais mencionados acima (ver tabela I), sem os aldeídos (3 vezes por 5 minutos cada), e pós-fixados em uma solução contendo os sais relacionados na Tabela I e 1% de tetróxido de ósmio por 1,5 horas em gelo.

Os fragmentos de tecidos foram então desidratados em série alcoólica crescente (50%, 70%, 95% e 100%) no intervalo de 10' para cada álcool (álcool 100%: 2 x 15') e transferidos para óxido de propileno (2 X 15'), sendo infiltrados e embebidos em resina Araldite 502, em uma proporção de 1:1 com óxido de propileno (1 h). Após este período, os fragmentos de brânquias permaneceram em resina na proporção 3:1 com óxido de propileno. Após terminado todo o procedimento acima mencionado (24 horas depois), os fragmentos foram mantidos em resina pura por 1 hora em estufa a 45°C e em seguida posicionados nas fôrmas para a confecção dos blocos já devidamente identificados para permitir secções transversais por toda a extensão do plano da lamela. Os blocos permaneceram em estufa a 60°C por 2 dias para a polimerização.

Cortes semi-finos (500 nm) foram feitos no Ultramicrotomo LEICA ULTRACUT UCT do Departamento de Biologia Celular, utilizando navalhas de vidro, e foram corados com azul de metileno 1% e azul de toluidina 1% em bórax 1% aquoso. Os cortes finos (70 nm) foram feitos no Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas e no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (C.M.E), utilizando navalha de diamante. Os cortes finos foram contrastados com acetato de uranila 5% (20') e citrato de chumbo (15') Reynolds (1963) e examinados e fotografados no microscópio JEOL JEM 1200 EXII (C.M.E).

### 3.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO SEPTO INTRALAMELAR

Foi fotografada apenas uma área na região do septo que divide longitudinalmente as lamelas, para cada um dos 6 animais controles e dos 6 animais experimentais. Procurou-se evitar a região onde se encontrava o núcleo e os espaços de hemolinfa, dando ênfase às regiões onde era possível observar os dobramentos de membrana preenchidos com mitocôndrias (estruturas características do septo). O aumento utilizado nas eletromicrografias foi de 15000 vezes, com ampliação de 2,4 vezes do negativo para o papel 18X24 cm, fornecendo um aumento final de 36.000 vezes.

A metodologia e as fórmulas utilizadas para fazer a análise morfométrica do septo foram retiradas de Weibel e colaboradores (1966) e Weibel (1969). Esta metodologia consiste de um sistema de teste em transparência na forma de uma grátícula de segmentos de 1 cm igualmente espaçados (Figura 2), que foi aplicado sobre cada uma das ampliações para estimar a fração de volume de mitocôndrias (volume de mitocôndrias/volume de citoplasma) e a densidade de área dos dobramentos de membrana (área da superfície dos dobramentos/volume de citoplasma).

O cálculo do volume relativo de mitocôndrias ( $V_m$ ) foi feito a partir da contagem do número de pontos (extremidades dos segmentos de reta do sistema teste), localizados sobre as mitocôndrias e o número de pontos sobre o citoplasma das células do septo na mesma micrografia. Não foram contados os pontos que estavam localizados sobre o núcleo e sobre os espaços de hemolinfa. O cálculo foi feito para cada micrografia utilizando a seguinte fórmula:  $V_m = (P_m/P_{cit}) \times 100$ , onde  $P_m$  refere-se ao número de pontos sobre as mitocôndrias e  $P_{cit}$  refere-se ao número de pontos localizados sobre o citoplasma.

A densidade de área dos dobramentos de membrana ( $S_i/V_i$  em  $\mu m^2/\mu m^3$  de citoplasma) no septo intralamelar foi estimado segundo a fórmula:  $S_i/V_i = (4 \times I_i)/(Z \times P_i)$ , onde  $I_i$  corresponde ao número de dobramentos que passam entre os espaços de 1 cm e exatamente sobre as suas extremidades,  $P_i$  refere-se ao número de pontos que estão localizados no citoplasma, ignorando os pontos que passam sobre o núcleo, espaços de hemolinfa e sobre os próprios dobramentos, e  $Z$  é o comprimento dos segmentos do sistema teste em  $\mu m$ , considerando-se a ampliação total da eletromicrografia (36.000X), ou seja: 0,278  $\mu m$ .

### 3.6 ANÁLISE DOS MICROVILOS APICAIS

A densidade de microvilos apicais pôde ser quantificada através de uma simples linha de 12,5 cm feita em transparência. Esta linha era alinhada com a base dos microvilos. Deste modo foi feita a contagem do número de microvilos que compreendiam este espaço. O número de microvilos foi então dividido pelo comprimento deste segmento de 12,5 cm em  $\mu m$  (3,472  $\mu m$ ), gerando o número de microvilos/ $\mu m$ .

Para a determinação da altura dos microvilos apicais foi utilizado o mesmo sistema teste de Weibel usado na análise morfométrica do septo intralamelar, mas com uma pequena alteração:

eram escolhidos apenas os microvilos que interceptavam os espaços de 1 cm na transparência, logo abaixo da cutícula. Com uma régua comum foram feitas as medidas das alturas nestes microvilos, que foram também convertidas em  $\mu\text{m}$  considerando-se o aumento total dos eletromicrografias (36.000X).

Testes estatísticos foram feitos utilizando o teste-t de Student não pareado ( $P \leq 0,05$ ) do programa Sigma Plot® for Windows (Versão 1.0), Jandel Corporation.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Ultra-estrutura das lamelas branquiais

#### 4.1.1 Aspecto morfológico e ultra-estrutural das brânquias de *Macrobrachium acanthurus* aclimatado em água-doce (0 ‰)

Através dos cortes transversais feitos ao longo da hemi-lamela branquial, observa-se claramente que a lamela está envolvida por toda a sua extensão por uma fina camada cuticular (Fig. 3), abaixo da qual observa-se um extenso sistema de microvilos apicais, também conhecidos como folhetos apicais, ocasionalmente acompanhados de pequenas mitocôndrias (Figs. 4 e 5). Estes microvilos são evaginações digitiformes da camada de células epiteliais denominadas células pilares. Estas projeções epiteliais aumentam a área de superfície das células pilares. Nestes animais (0 ‰) observa-se os espaços de hemolinfa que percorrem toda a extensão da lamela estando reduzidos a pequenas regiões, e os microvilos apicais que aparecem em apenas um dos lados da lamela branquial (Figs. 3 e 4), o que pode ter sido ocasionado pela própria orientação do corte. As células pilares por sua vez formam a camada de células epiteliais que se encontra logo abaixo da cutícula, mas nem sempre é possível observar claramente os seus limites basolaterais. Fazendo a conexão entre as células pilares adjacentes estão junções intercelulares e interdigitações (Fig. 6).

Neste tipo de corte fica evidente a presença de um septo dividindo a lamela branquial em dois compartimentos (Figs. 4 e 7). O septo intralamelar é largo e tem como característica a presença de um grande número de mitocôndrias que variam em forma e tamanho e que são freqüentemente envolvidas por dobramentos de membrana (Figs. 3 e 7). Outra característica marcante são os grânulos de glicogênio que estão presente nas células do septo em grande densidade (Fig. 7). Ainda

no septo estão os núcleos celulares que são grandes chegando a ocupar grande parte da área do septo intralamelar (Fig. 3), e ocasionalmente alguns aparelhos de Golgi (Fig. 8).

#### 4.1.2 Aspecto morfológico e ultra-estrutural das brânquias de *Macrobrachium acanthurus* aclimatado em água do mar diluída (28 ‰)

A ultra-estrutura encontrada nos animais experimentais é basicamente a mesma encontrada nos camarões controles (0 ‰). A lamela branquial, em cortes transversais, é envolvida por uma fina cutícula (aproximadamente 0,36  $\mu\text{m}$  de espessura), assim como foi descrito anteriormente para os animais controles (Fig. 9). Nesta aclimação (28 ‰) os espaços de hemolinfa são mais evidentes e contínuos e aparecem próximos da camada cuticular, facilitando a visualização do septo intralamelar (Figs. 9 e 10). Os microvilos apicais das células pilares podem ser visualizados sobre os espaços de hemolinfa e logo abaixo da cutícula em apenas um dos lados da lamela branquial (Figs. 9 e 11), o que pode ter sido ocasionado pela própria orientação do corte, assim como também ocorreu com os animais controles. Mesmo não sendo possível observar os limites baso-laterais das células pilares, pode-se visualizar claramente as junções intercelulares fazendo a conexão entre as células adjacentes (Fig. 12).

No citoplasma do septo intralamelar destes animais também é possível observar os núcleos celulares e os grânulos de glicogênio, assim como inúmeras mitocôndrias envolvidas por dobramentos de membrana (Figs. 13 e 14). Visualmente e em baixo aumento acredita-se que a quantidade de mitocôndrias bem como os dobramentos de membrana aumentaram em número nos animais aclimatados em água do mar diluída (28 ‰) quando comparados com os animais controles,



mas este tipo de relação só poderá ser comprovada com a análise morfométrica do septo intralamelar.

#### 4.2 Análise morfométrica do septo intralamelar e dos microvilos apicais nas lamelas branquiais dos camarões controles (0 ‰) e experimentais (28 ‰)

##### 4.2.1 Densidade de área de dobramentos de membrana e volume mitocondrial

A área citoplasmática do septo intralamelar dos camarões aclimatados em água doce e em água do mar diluída, como dito anteriormente, é composto principalmente por um conjunto de mitocôndrias associadas a dobramentos de membrana. Partindo-se do pressuposto de que essas organelas citoplasmáticas estão ligadas direta ou indiretamente aos processos osmorregulatórios responsáveis pela homeostase interna destes animais, foi necessário analisar em que quantidade estas organelas se encontravam no citoplasma nos diferentes tipos de aclimação (0 e 28 ‰).

Não houve diferença significativa na densidade de dobramentos de membranas e no volume relativo de mitocôndrias entre os animais aclimatados em água doce (0 ‰) e em água do mar diluída (28 ‰). Tais resultados podem ser observados na Tabela II.

##### 4.2.2 Densidade e altura dos microvilos apicais

Assim como as mitocôndrias e os dobramentos de membrana das células do septo, os microvilos apicais também influem nos processos de osmorregulação, direta ou indiretamente. Deste modo foi interessante saber até que ponto estes microvilos são sensíveis às alterações de salinidade do meio externo.

Analisando estatisticamente os dados obtidos com a morfometria das micrografias, verificou-se que não houve diferença significativa na densidade de microvilos apicais entre os animais controles (0 ‰) e os animais experimentais (28 ‰). Apenas a altura dos microvilos apicais das células pilares nos animais experimentais apresentou diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) em relação aos animais controles. Todos os resultados podem ser observados na Tabela III.

TABELA II – DENSIDADE DE SUPERFÍCIE POR VOLUME ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ) E VOLUME MITOCONDRIAL RELATIVO (%) DAS CÉLULAS DO SEPTO INTRALAMELAR DAS BRÂNQUIAS DE *Macrobrachium acanthurus* ACLIMATADO EM ÁGUA DOCE (0 ‰) E EM ÁGUA DO MAR DILUÍDA (28 ‰).

Situação de aclimação	Densidade de superfície por volume ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ )	Volume mitocondrial (%)
Controle 0 ‰	$0,82 \pm 0,12$ (6)*	$22,9 \pm 0,01$ (6)
Experimental 28 ‰	$0,76 \pm 0,13$ (6)	$21,0 \pm 0,05$ (6)

\* média  $\pm$  erro padrão da média (n), sendo n o número de animais utilizados para análise morfométrica.

TABELA III – DENSIDADE E ALTURA DOS MICROVILOS APICAIS NAS BRÂNQUIAS DE *Macrobrachium acanthurus* ACLIMATADO EM ÁGUA DOCE (0 ‰) E EM ÁGUA DO MAR DILUÍDA (28 ‰).

Situação de aclimação	Densidade de microvilos apicais ( $\text{No}/\mu\text{m}$ )	Altura dos microvilos apicais ( $\mu\text{m}$ )
Controle 0 ‰	$3,92 \pm 0,22$ (6)*	$0,54 \pm 0,07$ (6)
Experimental 28 ‰	$4,08 \pm 0,19$ (6)	$0,86 \pm 0,07^\diamond$ (6)

\* Idem Tabela I.

◆ Significativamente diferente em relação ao controle ( $P \leq 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A constituição da lamela branquial do camarão palaemonídeo *Macrobrachium acanthurus* aclimatado em água doce (0 ‰) basicamente é a mesma encontrada no camarão *Macrobrachium olfersii* (Freire e McNamara, 1995). A grande maioria dos estudos ultra-estruturais descrevem que as brânquias da maioria dos decápodos são formadas basicamente por uma fina camada cuticular que envolve a lamela branquial por toda a sua extensão. Esta cutícula representa uma barreira entre o meio interno e o meio externo e sua espessura pode variar de 0,2 a 20  $\mu\text{m}$  entre indivíduos da mesma espécie, entre espécies da mesma família e entre espécies de famílias diferentes. Na espécie aqui estudada a cutícula tem aproximadamente 0,26  $\mu\text{m}$  de espessura nos animais controles (0 ‰) e 0,36  $\mu\text{m}$  de espessura nos experimentais (28 ‰). Esta diferença morfológica pode estar correlacionada com as diferenças fisiológicas e bioquímicas encontradas nos crustáceos osmorreguladores (Péqueux, 1995).

Outra característica marcante do epitélio branquial dos palaemonídeos é a camada de células epiteliais que localizam-se logo abaixo da cutícula. Esta camada de células é formada única e exclusivamente pelas chamadas células pilares, que se estendem sobre os espaços de hemolinfa formando flanges. Esta camada de células epiteliais é caracterizada por apresentar na sua superfície projeções de membrana digitiformes, ou evaginações, que são denominadas microvilos apicais. Da maneira como estes microvilos estão posicionados na superfície das células pilares, podem ocupar grande parte da área das células pilares amplificando a sua área superficial de membrana, aumentando a absorção de íons através da lamela branquial (Kikushi e Matsumasa, 1993 e 1997; Freire e McNamara, 1995; McNamara e Lima, 1997). Ocasionalmente algumas mitocôndrias

podem ser visualizadas na base dos microvilos, assim como algumas junções septadas, desmosomos ou junções do tipo “gap” fazendo a conexão entre as células pilares adjacentes. Este tipo de estrutura celular encontrado nas brânquias dos palemonídeos: fina camada de cutícula, extenso sistema de microvilos apicais das células pilares associados às mitocôndrias, a presença de junções intercelulares e o septo intralamelar maciço e rico em mitocôndrias e dobramentos de membrana, indica que o epitélio branquial está envolvido na respiração, na regulação iônica e na osmorregulação (Lawson *et al.*, 1994; Freire e McNamara, 1995; Kikushi e Matsumasa, 1997; McNamara e Lima, 1997).

As possíveis modificações na ultra-estrutura das brânquias da grande maioria dos crustáceos decápodos dependem essencialmente da salinidade do meio e do tempo de exposição a que estes animais estão expostos (Freire e McNamara, 1995; Pequéux, 1995). Quando um animal é submetido a curto prazo de tempo a condições de salinidade do meio muito diferentes daquela encontrada no seu ambiente de origem, a primeira mudança que ocorre é fisiológica, ou seja: a tendência é que a composição do fluido sangüíneo (hemolinfa) seja alterada a fim de reduzir o gradiente osmótico. Mas quando este mesmo animal é submetido a longo prazo de tempo a essas mesmas condições, as brânquias podem apresentar diversas alterações, dentre as quais na sua ultra-estrutura à fim atuar na estabilização das novas condições ambientais. Podemos analisar como exemplo a migração de um caranguejo marinho eurihalino para um ambiente onde a osmolalidade está bem abaixo da osmolalidade da sua hemolinfa. Estes animais sofrem um influxo passivo de água e um efluxo passivo de sais. Para reduzir este movimento passivo de água e sais estes animais se utilizam de duas estratégias: toleram uma moderada diminuição na osmolalidade da sua hemolinfa (curto-prazo) e diminuem a

permeabilidade da sua superfície corporal a longo-prazo (Onken e Riestenpatt, 1998).

As brânquias nos crustáceos decápodos passam por uma reorganização ultra-estrutural quando estes animais são expostos a condições estressantes de salinidade e as primeiras modificações ultra-estruturais podem ser vistas no epitélio branquial: na espessura da cutícula e na organização dos microvilos apicais das células pilares. McNamara e Lima (1997), ao aclimatarem a espécie de camarão de água doce *Macrobrachium olfersii* em água do mar diluída (21 ‰ e 28 ‰) perceberam mudanças ultra-estruturais na lamela branquial principalmente nos microvilos apicais. Estes microvilos perdem a sua disposição em tufo regulares e distribuição regular acima das células pilares, além de diminuir significativamente a sua densidade e altura. A altura dos microvilos passa de 0,8  $\mu\text{m}$  para 0,3  $\mu\text{m}$  no intervalo de aclimação de 0 ‰ a 21 ‰. Sendo que em 28 ‰ estes microvilos estão quase ausentes. Na espécie hololimnética *Macrobrachium potiuna* aclimatada em água doce, a altura dos microvilos apicais foi de  $0,68 \pm 0,07 \mu\text{m}$  (n=7) (McNamara e Torres, comunicação pessoal). A quantidade de microvilos por micrômetro sobre as células pilares de *M. olfersii* também diminuem significativamente de 6,20/ $\mu\text{m}$  (0 ‰), passando para 5,00/ $\mu\text{m}$  (21 ‰) e chegando a 4,00/ $\mu\text{m}$  em 28 ‰ (McNamara e Lima, 1997). Em *M. potiuna* a densidade foi de  $9,14 \pm 0,51/\mu\text{m}$  (n=7). Com a diminuição na área de superfície de membrana das células pilares devido a diminuição na densidade dos microvilos apicais, o influxo passivo de sais através da lamela branquial é dificultado, diminuindo a possibilidade de dano celular das células epiteliais frente ao aumento da concentração de íons no interior destas células. O contrário pode ser observado nas espécies marinhas e estuarinas aclimatadas em água doce. Neste caso ocorre o aumento na densidade e na altura dos microvilos quando os animais são

submetidos à redução de salinidade. Essa adaptação permite que o animal absorva ativamente os sais que foram perdidos para o meio externo devido a diferença de concentração. Este resultado é corroborado com a descoberta de uma enzima ATPásica nas evaginações de membrana das células pilares, provavelmente uma  $H^+$  ATPase vacuolar. A presença de mitocôndrias sub-apicais abaixo dos microvilos sugere o suprimento de ATP para essas enzimas apicais na absorção de sal (McNamara e Lima, 1997; McNamara e Torres, 1999), e os sítios ATPásicos diminuem de densidade quando espécies hiporreguladoras estão em um ambiente hiper-osmótico, o contrário acontecendo para espécies hiper-reguladoras expostas a um ambiente hipo-osmótico (Kikushi e Matsumasa, 1993; McNamara e Lima, 1997; Onken e Riestenpatt, 1998).

Os resultados obtidos com a análise morfométrica dos microvilos apicais nas células pilares nas brânquias do camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus* aclimatado em água do mar diluída (28 ‰) não foram totalmente coincidentes com a literatura citada. A altura dos microvilos apicais aumentou nos animais aclimatados, enquanto o esperado era que a altura dos microvilos diminuíssem como o que aconteceu na espécie *M. olfersii* (McNamara e Lima, 1997). A média das alturas dos microvilos obtida nos animais controles (0 ‰) da espécie estudada foi de  $0,54 \pm 0,07 \mu m$  (6), enquanto que nos animais experimentais (28 ‰) a média foi de  $0,86 \pm 0,07 \mu m$  (6). Este valor encontrado nos animais aclimatados a 28 ‰ por 10 dias é semelhante ao valor encontrado em *M. olfersii* aclimatado por 10 dias em 0 ‰ ( $0,8 \mu m$ ). O número de microvilos nas regiões apicais foi essencialmente constante:  $3,98 \pm 0,22/\mu m$  (6) nos animais controles (0 ‰) para  $4,08 \pm 0,19/\mu m$  (6) nos animais experimentais (28 ‰), sendo que o esperado seria que o número de microvilos diminuísse significativamente. Para tais resultados, podemos inferir que o tempo de exposição de 10 dias

em água do mar diluída (28 ‰) nesta espécie (*M. acanthurus*), não foi o suficiente para visualizar as prováveis modificações ultra-estruturais que a literatura relata, ou que esta espécie é forte reguladora da concentração osmótica na hemolinfa nesta salinidade e se utiliza de outras estratégias e/ou mecanismos, dispensando o gasto energético para as possíveis mudanças ultra-estruturais na lamela branquial.

A outra possível modificação ultra-estrutural que pode ocorrer nas lamelas branquiais é quanto a grande complexidade e extensão de junções septadas que unem as células pilares adjacentes. A simples presença destas junções intercelulares caracteriza o epitélio branquial como sendo um epitélio transportador de íons (Kikushi e Matsumasa, 1997). Estas junções promovem a adesão celular entre células adjacentes restringindo a permeabilidade intercelular das brânquias (Lawson *et al.*, 1994). É comum observar que este complexo de junções tende a aumentar nas espécies de crustáceos dulcícolas aclimatados em água do mar diluída, e diminuir nos crustáceos marinhos aclimatados em água doce. Esta diferença sugere que a permeabilidade inter-celular aos íons e o influxo dos íons  $\text{Na}^+$  sejam diminuídos nos crustáceos decápodos mantidos em meio mais salino, dado o maior desenvolvimento das junções septadas (Lawson *et al.*, 1994). Esta alteração ultra-estrutural pode refletir o aumento da resistência da via de absorção de íons. Além da redução na sua entrada, deve ocorrer também um aumento no transporte ativo destes íons para o meio externo nos animais que hiporregulam. Nos indivíduos da espécie *M. acanthurus* estas junções estão aparentemente presentes tanto nos animais controles (0 ‰) quanto nos animais experimentais (28 ‰), de forma semelhante não tendo sido possível relacionar alterações com a aclimação a meios de salinidade diferentes.

A aclimação em diferentes salinidades também pode causar mudanças ultra-estruturais nas células do septo intralamelar. Grande parte da área do septo é constituída por dobramentos de membrana associados às mitocôndrias. Ainda no septo é possível observar os núcleos celulares, grânulos de glicogênio e ocasionalmente alguns aparelhos de golgi, porém estas organelas parecem não sofrer com as alterações osmóticas no meio interno frente às alterações de salinidade do meio externo. Esta descrição morfológica do septo condiz com o padrão já descrito outros camarões palemonídeos (Freire e McNamara, 1995; McNamara e Lima, 1997; McNamara e Torres, comunicação pessoal). As variáveis utilizadas para se avaliar as mudanças ultra-estruturais foram a densidade de dobramentos por volume de citoplasma ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ) e o volume relativo de mitocôndrias (%). Análises feitas no epitélio branquial do tanaidáceo estuarino *Sinelobus stanfordi* aclimatado a água salobra (17 ‰), revelou que as células do septo do branquiostergito apresentam uma extensa e densa massa de dobramentos de membrana que geralmente estão acompanhados de inúmeras mitocôndrias (Kikushi e Matsumasa, 1993). A densidade de dobramentos de membrana aumenta nas células do septo das brânquias do camarão *M. olfersii* aclimatado em altas salinidades (21 ‰). A área de dobramentos ( $\mu\text{m}^2$ ) por volume de citoplasma ( $\mu\text{m}^3$ ) aumentou de  $2,01 \pm 0,15 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (0 ‰) para  $2,91 \pm 0,19 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (21 ‰) (Freire e McNamara, 1995). Este padrão não foi observado em *M. acanthurus* aclimatado em água do mar diluída (28 ‰), onde não houve diferenças significativas; a densidade dos dobramentos foi de  $0,82 \pm 0,12 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (6) nos animais controles para  $0,76 \pm 0,13 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (6) nos animais experimentais (28 ‰). O volume relativo de mitocôndrias em *M. acanthurus* permaneceu constante tanto nos animais aclimatados em água doce como nos animais aclimatados em meio salino diluído ( $22,9 \pm 0,15 \%$  (6) e  $21,0 \pm 0,05 \%$  (6) respectivamente), assim como ocorreu para *M. olfersii* onde não houve diferença



significativa para esta variável ( $12,56 \pm 0,69$  % em 0 ‰ e  $14,26 \pm 0,71$  e em 21 ‰). Estes dados complementam a hipótese de que outras estratégias são utilizadas na adaptação de *M. acanthurus* a meios de salinidades diferentes. Cabe aqui ressaltar que *M. acanthurus* e *M. olfersii* ocupam o mesmo ambiente, ou seja, água doce próxima ao estuário, tendo sua reprodução dependente de água salgada (Moreira *et al.*, 1983).

Estudos revelam que a superfície de membrana dos dobramentos contém sítios de atividade ATPásica sensível a ouabaina ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase) (Kikushi e Matsumasa, 1993; McNamara e Torres, 1999), e a localização desta enzima nos dobramentos de membrana foi relacionada com as flutuações na salinidade do meio (McNamara e Lima, 1997). Alguns estudos sugerem que o funcionamento desta enzima está intimamente ligado a estes dobramentos, ou seja: aumento de salinidade do meio pode reduzir significativamente os dobramentos já existentes, e como consequência desta redução verifica-se uma diminuição da atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, gerando redução na entrada ativa de  $\text{Na}^+$  (McNamara e Lima, 1997). Contudo, acredita-se que esta enzima atue tanto na hiper- quanto na hipo-regulação, o que torna complexa a interpretação dos resultados de experimentos de aclimação. A presença da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase e sua possível maior atividade nos animais em água doce sugere o transporte ativo de íons sódio para os espaços de hemolinfa a fim de compensar a baixa concentração deste íon no meio externo diluído, sendo que o ATP gasto neste transporte é fornecido diretamente pelas mitocôndrias que estão intimamente associadas aos dobramentos de membrana (McNamara e Lima, 1997).

Pode-se concluir que as grandes modificações que ocorrem na estrutura celular das brânquias como: no sistema de microvilos apicais, na quantidade de mitocôndrias, na disposição dos dobramentos de

membrana nas células do septo, na espessura da cutícula e etc., demonstram a natureza maleável do epitélio branquial frente às alterações da salinidade do meio, e indicam que o epitélio branquial definitivamente está envolvido com a respiração, trocas gasosas e com o transporte ativo de íons na osmorregulação dos fluidos corporais (Kikushi e Matsumasa, 1993; Freire e McNamara, 1995; McNamara e Lima, 1997).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) CHEN, J-C. & PENG-GEK CHIA, 1997. Osmotic and ionic concentrations of *Scylla serrata* (Forsk.) subjected to different salinity levels. *Comp. Biochem. Physiol*, 83A: 701-708.
- 2) FREIRE, C. A. & J. C. McNAMARA, 1992. Involvement of the central nervous system in neuroendocrine mediation of osmotic and ionic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *Gen. Comp. Endocrin*, 88: 316-327.
- 3) FREIRE, C. A. & J. C. McNAMARA, 1995. Fine structure of the gills of the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): Effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the lamellar septum in ion uptake. *J. Crust. Biol*, 15(1): 103-116.
- 4) FREIRE, C. A., J. C. McNAMARA, J. C. ROSA & L. J. GREENE, 1995. Neuroendocrine control of osmotic refulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda): Free amino acid concentrations in the hemolymph. *General and Comparative Endocrinology*. *Gen. Comp. Endocrin*, 100: 83-91.
- 5) FUNGE-SMITH, S. J., A. C. TAYLOR., J. WHITLEY & J. H. BROWN, 1995. Osmotic e ionic regulation in the giant Malaysian fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), with special reference to strntium and bromine. *Comp. Biochem. Physiol*, Vol. 110 A. N° 4, pp. 357-365.
- 6) KIKUCHI, S & M. MATSUMASA, 1993. Two ultrastructural distinct types of transporting tissues, the branchiostegal and the gill epithelia, in na estuarine tanaid, *Sinelobus stanfordi* (Crustacea, Pecarida). *Zoomorphology*, 113: 253-260.
- 7) KIKUCHI, S & M. MATSUMASA, 1997. Ultrastructural evidence for osmoregulatory function of the sternal epithelia in some gammaridean amphipods. *J. Crust. Biol*, 17(3): 337-388.
- 8) LAWSON, S. L., M. B. JONES & R. M. MOATE, 1994. Structural variability and distribution of the cells in a posterior gill of *Carcinus maenas* (Decapoda: Brachyura). *J. Mar. Biol. Ass. U. K*, 74: 771-785.

- 9) LUCU, C., 1993. Ion transport in the gill epithelium of aquatic crustacea. *J. Exp. Zool*, 265: 378-386.
- 10) LUQUET, C., G. PELLERANO & G. ROSA, 1997. Salinity-induced changes in the fine structure of the gills of the semiterrestrial estuarine crab, *Uca uruguayensis* (Nobili, 1901) (Decapoda, Ocypodidae). *Tissue & Cell*, 29(4): 495-501.
- 11) McNAMARA, J. C., 1987. The time course of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Decapoda, Palaemonidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*, 107: 245-251
- 12) McNAMARA, J. C. & A. G. LIMA, 1997. The route of ion and water movements across the gill epithelium of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae): Evidence from ultrastructural changes induced by acclimation to saline media. *Biol. Bull*, 192: 321-331.
- 13) McNAMARA, J. C. & TORRES, A. H. , 1999. Ultracytochemical location of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *J. Exp. Zool*, 284 (no prelo)
- 14) MOREIRA, G. S., J. C. McNAMARA, S. E. SHUMWAY & P. S. MOREIRA, 1983. Osmoregulation and respiratory metabolism in Brazilian *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol*, 74A: 57-62.
- 15) ONKEN, H. & S. RIESTENPATT, 1998. NaCl absorption across aplit gill lamellae of hyperregulating crabs: Transport mechanisms and their regulation. *Comp. Biochem. Physiol*, 119(A): 883-893.
- 16) PEQUÉUX, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol*, 15(1): 1-60.
- 17) SOUZA, S. C. R. & G. S. MOREIRA, 1994. Neuroendocrine influence on whole animal and tissue respiration and on osmoionic regulation in the hololimnetic shrimp *Macrobrachium potiuna* (Muller, 1880). *J. Crust. Biol*, 14 (1): 36-46.
- 18) WEIBEL, E. R., 1969. Stereological principles for morphometry in electron microscopical cytology. *Int. Ver. Cytol*, 26: 235-302.

- 19) WEIBEL, ER., G.S. KISTLER & W.F. SCHERLE, 1966. Practical stereological methods for morphometric cytology. J. Cell. Biol, 30: 23-38.

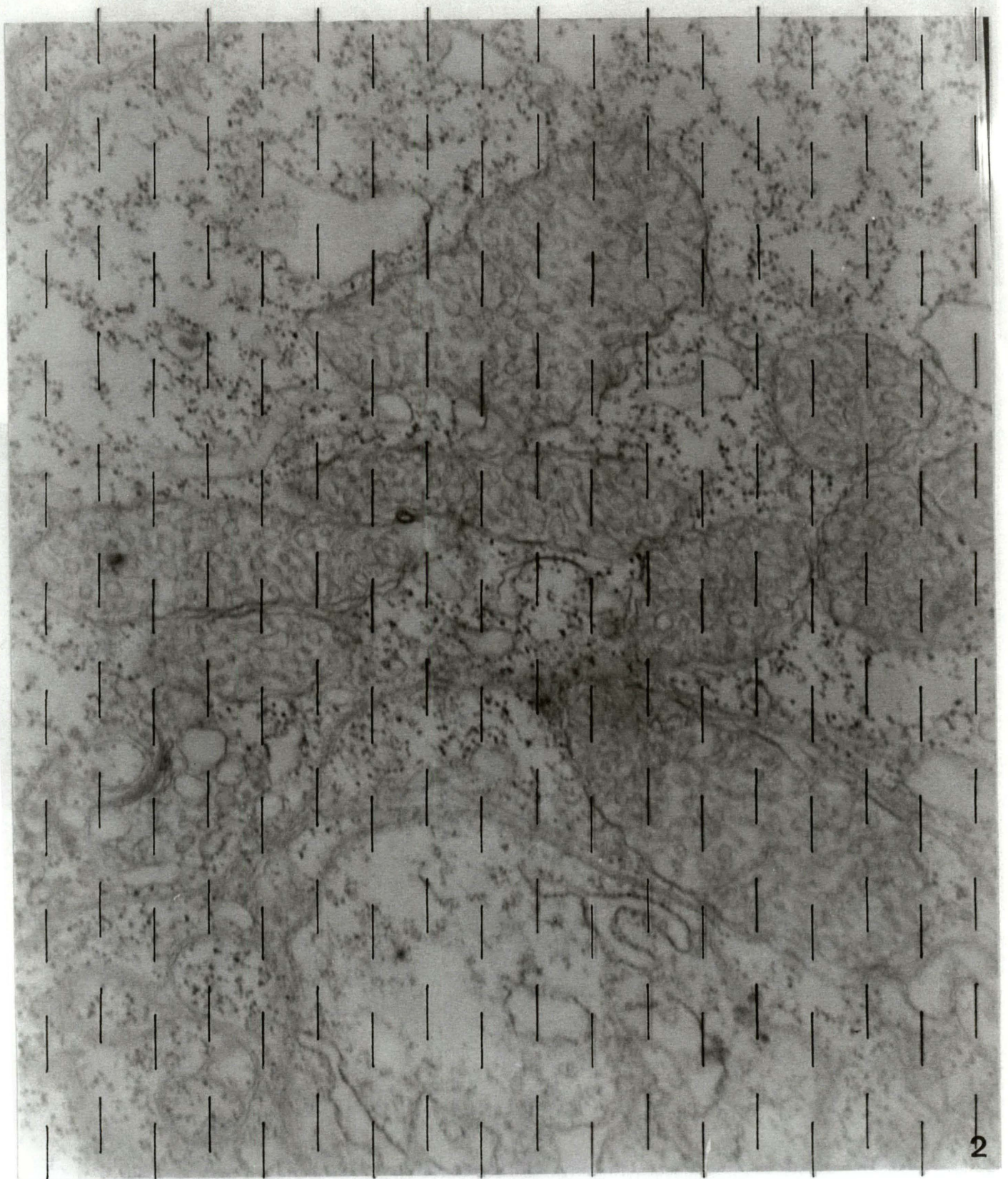
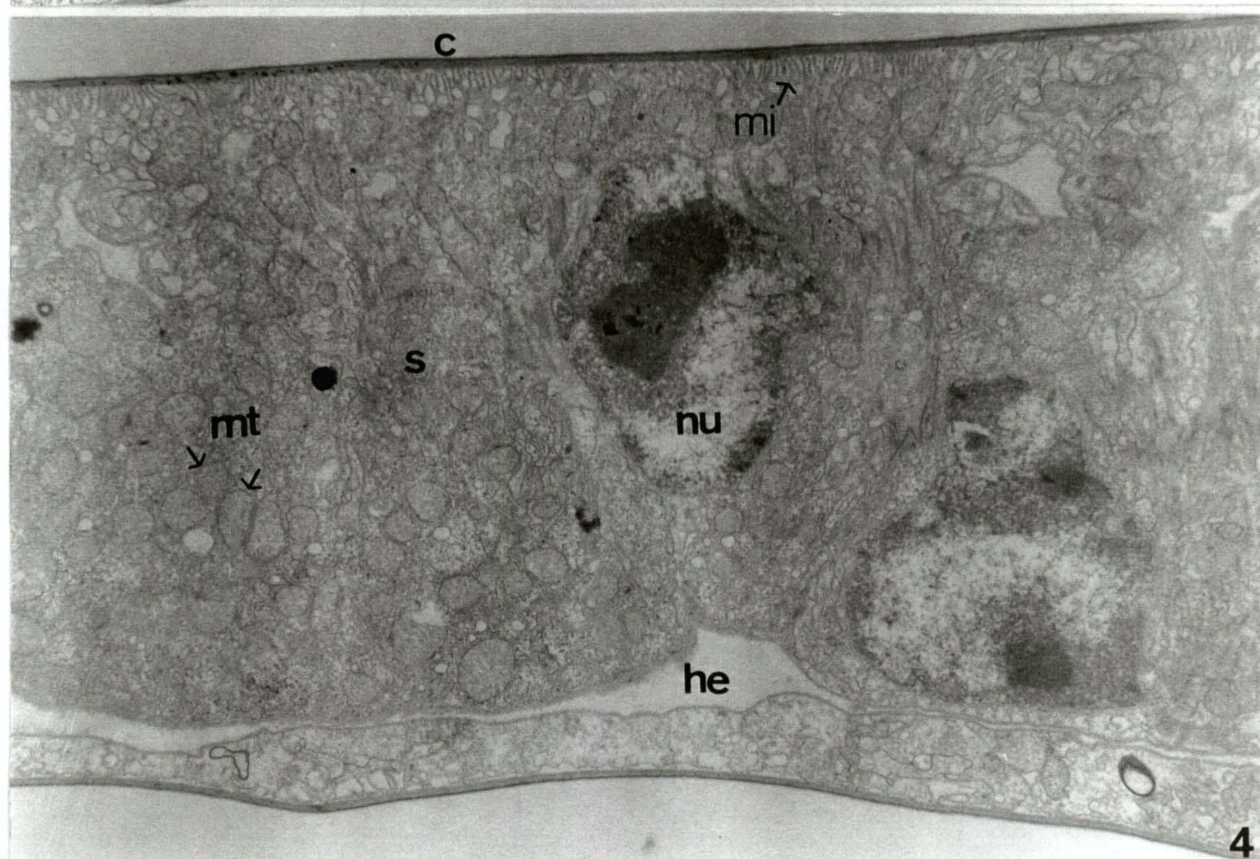
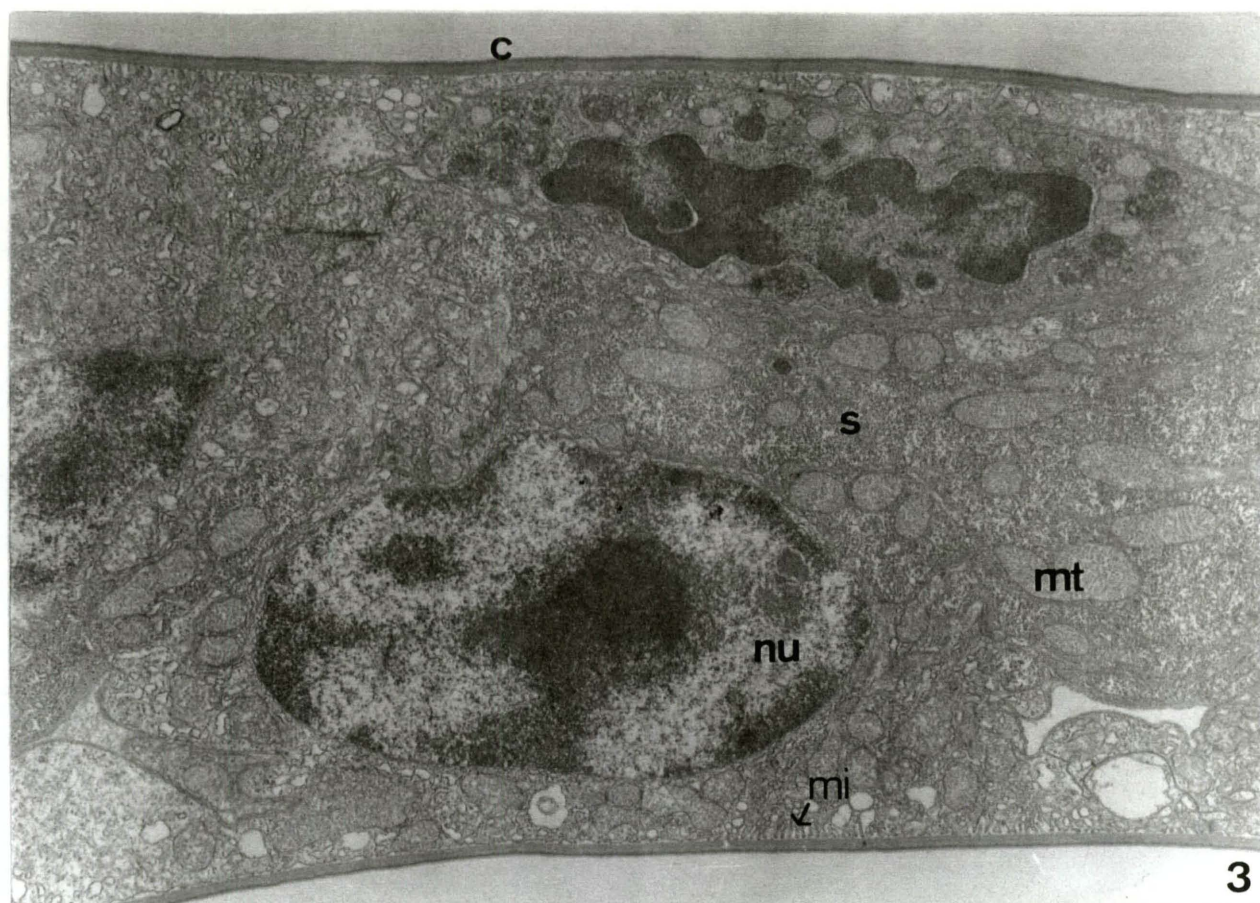


Figura 2 - Exemplo de aplicação do sistema teste para análise morfométrica das células do septo intralamelar. Aumento: 36.000X.





Figuras 3 e 4 - *Macrobrachium acanthurus* em água 0 ‰. Corte transversal de uma hemi-lamela branquial. Cutícula (c); septo (s); mitocôndria (mt); núcleo (nu); espaço de hemolinfa (he); microvilos (mi). Aumento: 3.900X.



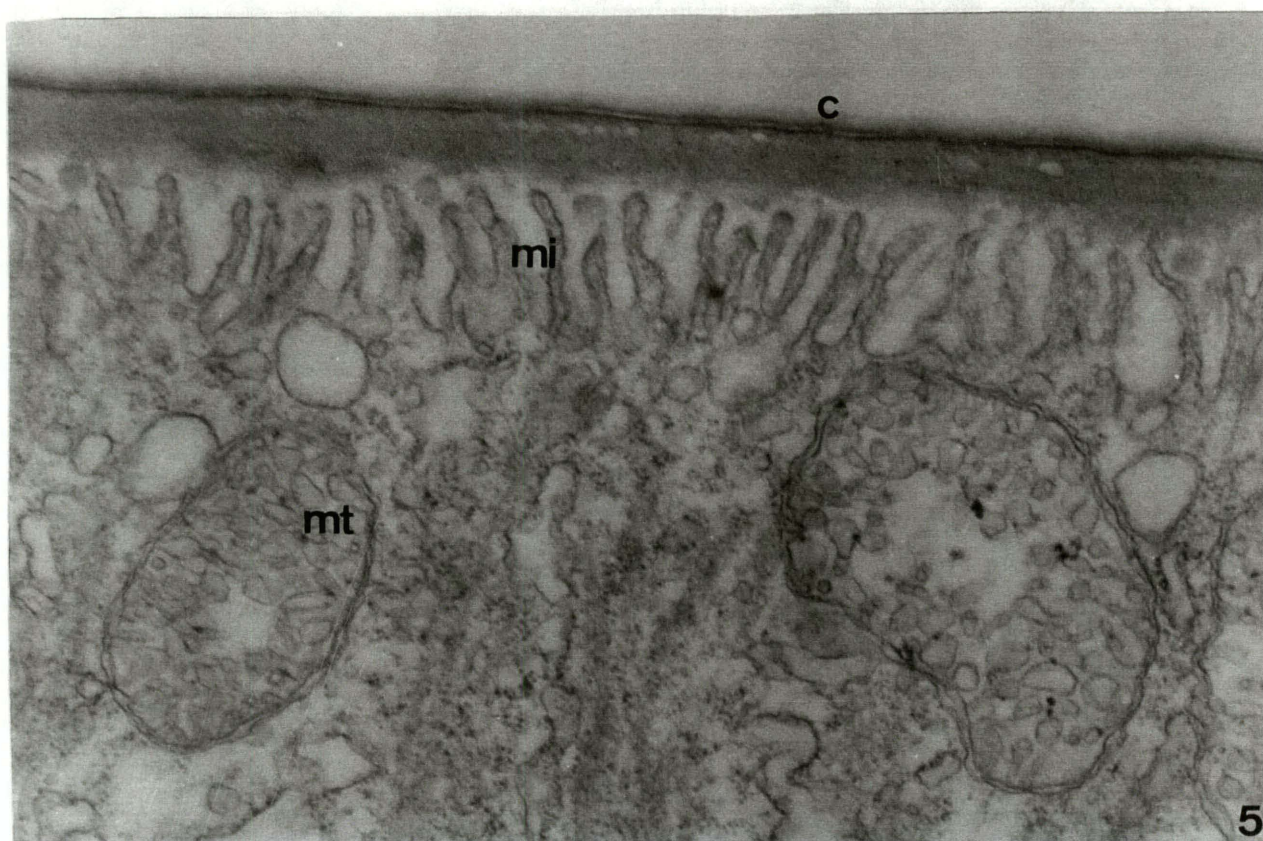


Figura 5 - *Macrobrachium acanthurus* em água 0 ‰. Região apical da célula pilar com sistema de microvilos (mi). Cutícula (c); mitocôndria (mt). Aumento: 36.000X

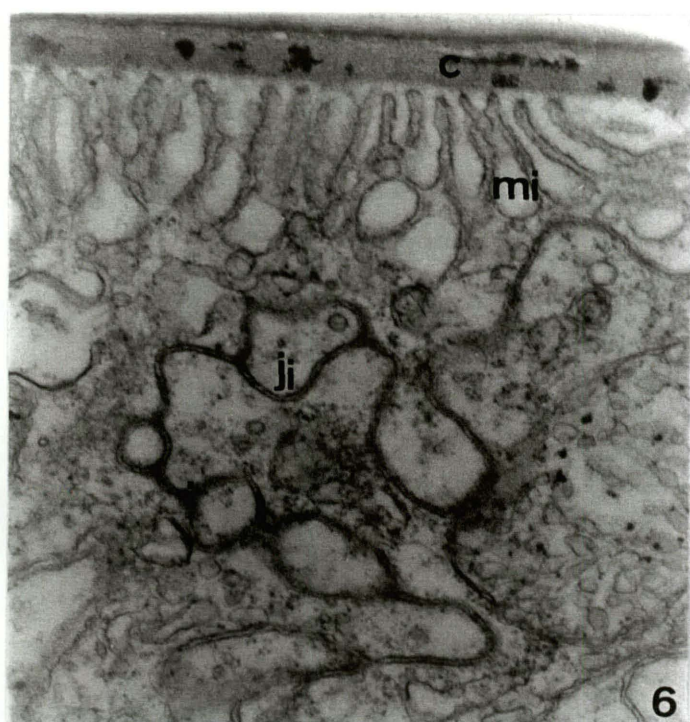


Figura 6 - *Macrobrachium acanthurus* em água 0 ‰. Região apical mostrando complexo juncional entre duas células pilares. Cutícula (c); microvilos (mi); junções intercelulares (ji). Aumento: 32.500X.



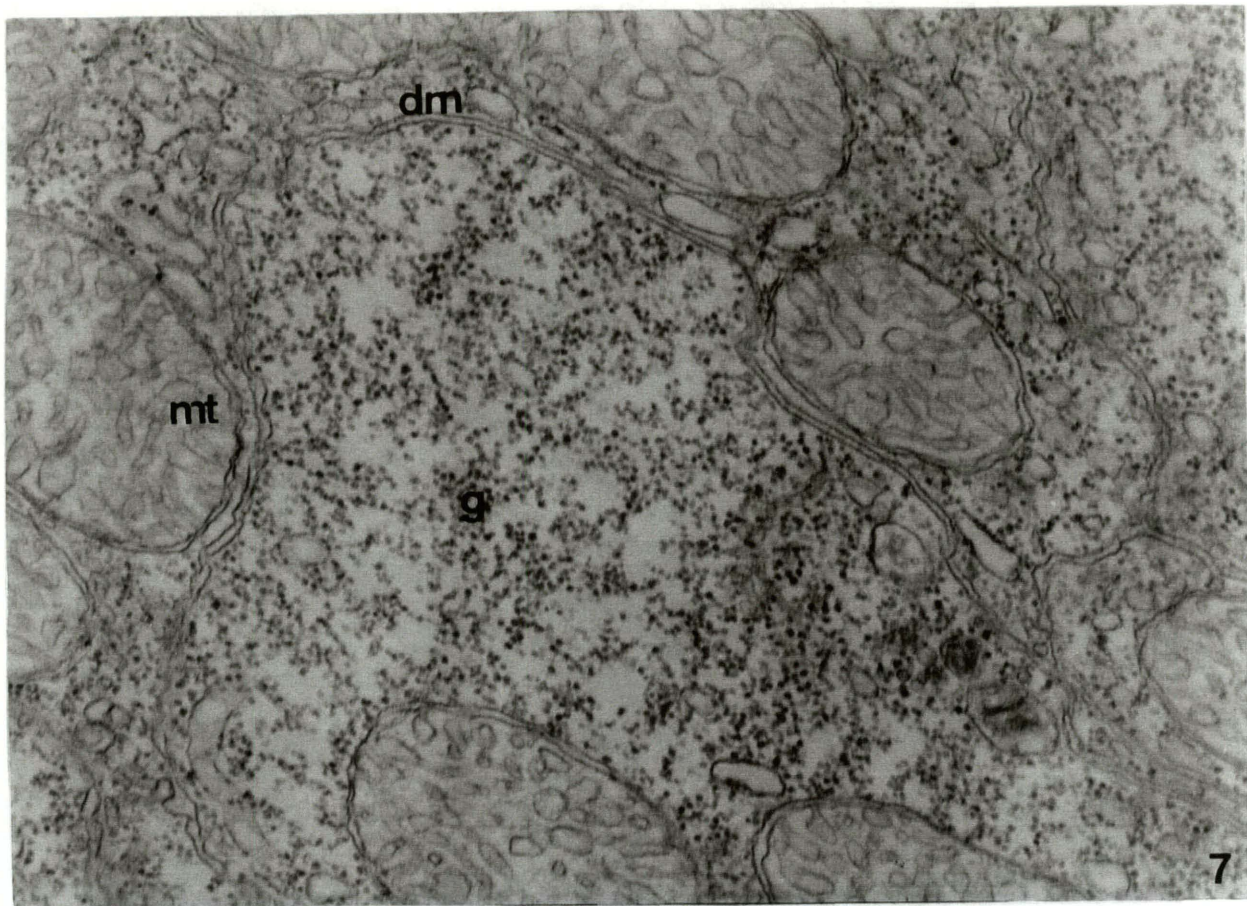


Figura 7 - *Macrobrachium acanthurus* em água 0 ‰. Região do septo intralamelar mostrando grânulos de glicogênio (g), mitocôndrias (mt) e dobramentos de membrana (dm). Aumento: 36.000X.

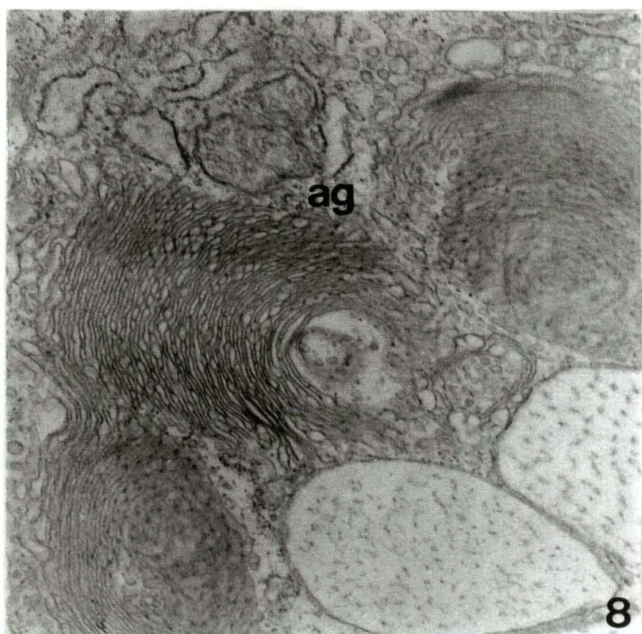
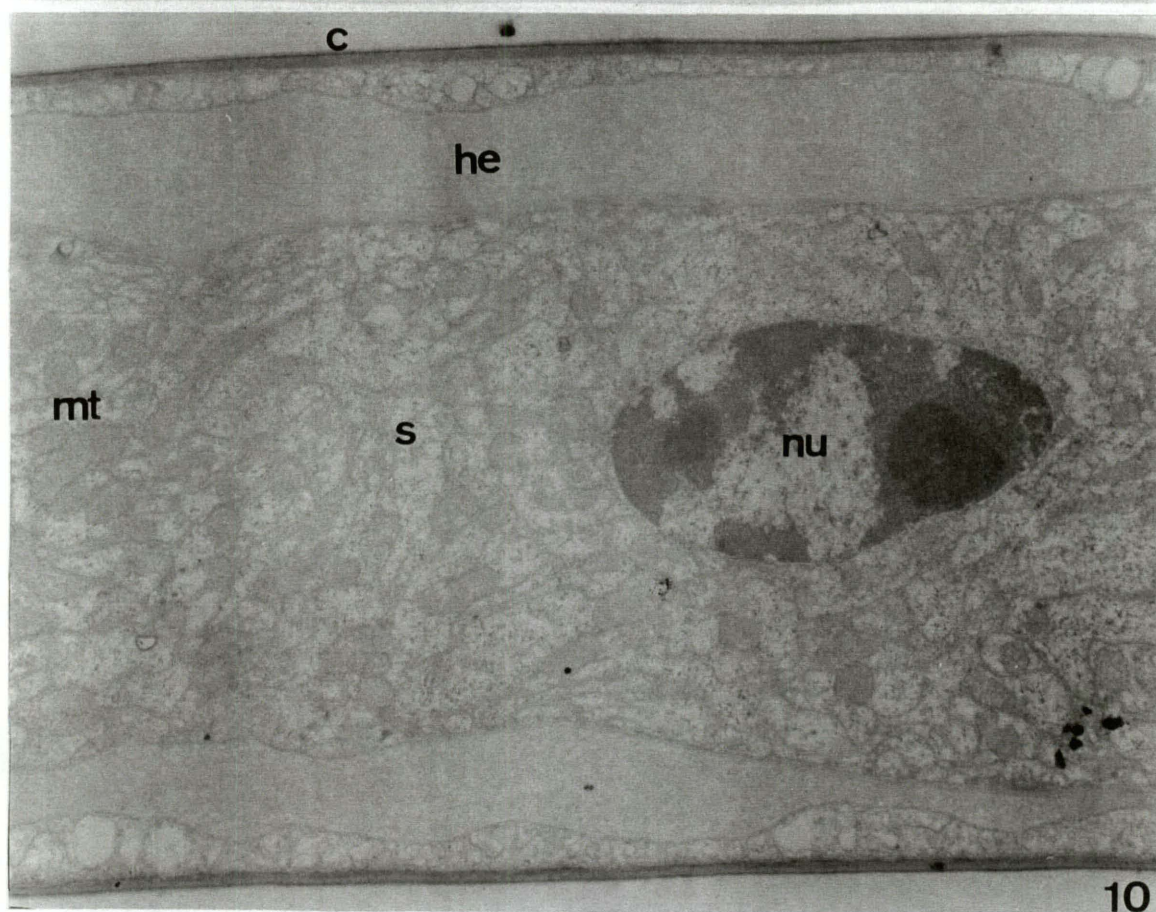
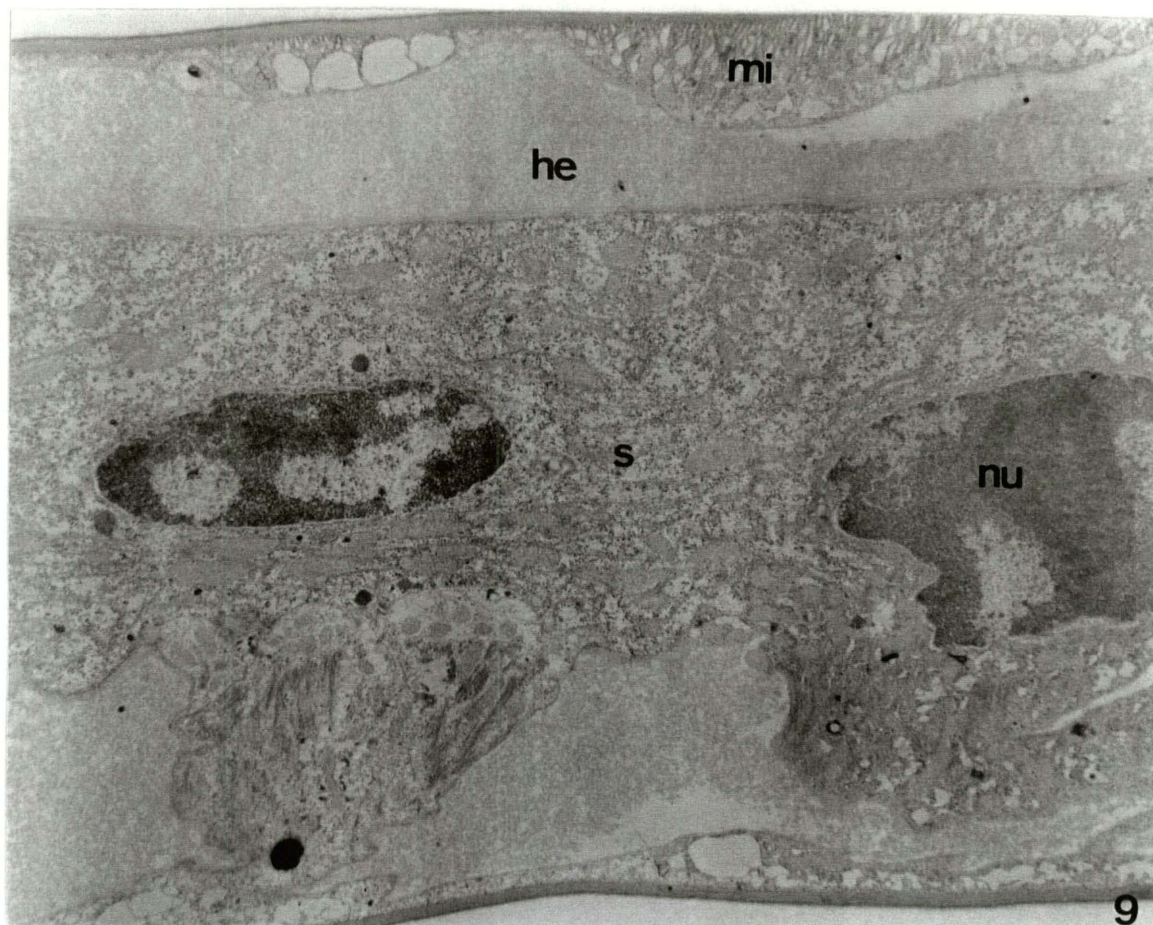


Figura 8 - *Macrobrachium acanthurus* em água 0 ‰. Aparelhos de golgi (ag) na região do septo intralamelar. Aumento: 19.500X.





Figuras 9 e 10 - *Macrobrachium acanthurus* em água 28 ‰. Corte transversal de uma hemi-lamela branquial. Cutícula (c); microvilos (mi); espaço de hemolinfa (he); septo (s); núcleo (nu); mitocôndria (mt). Aumento:



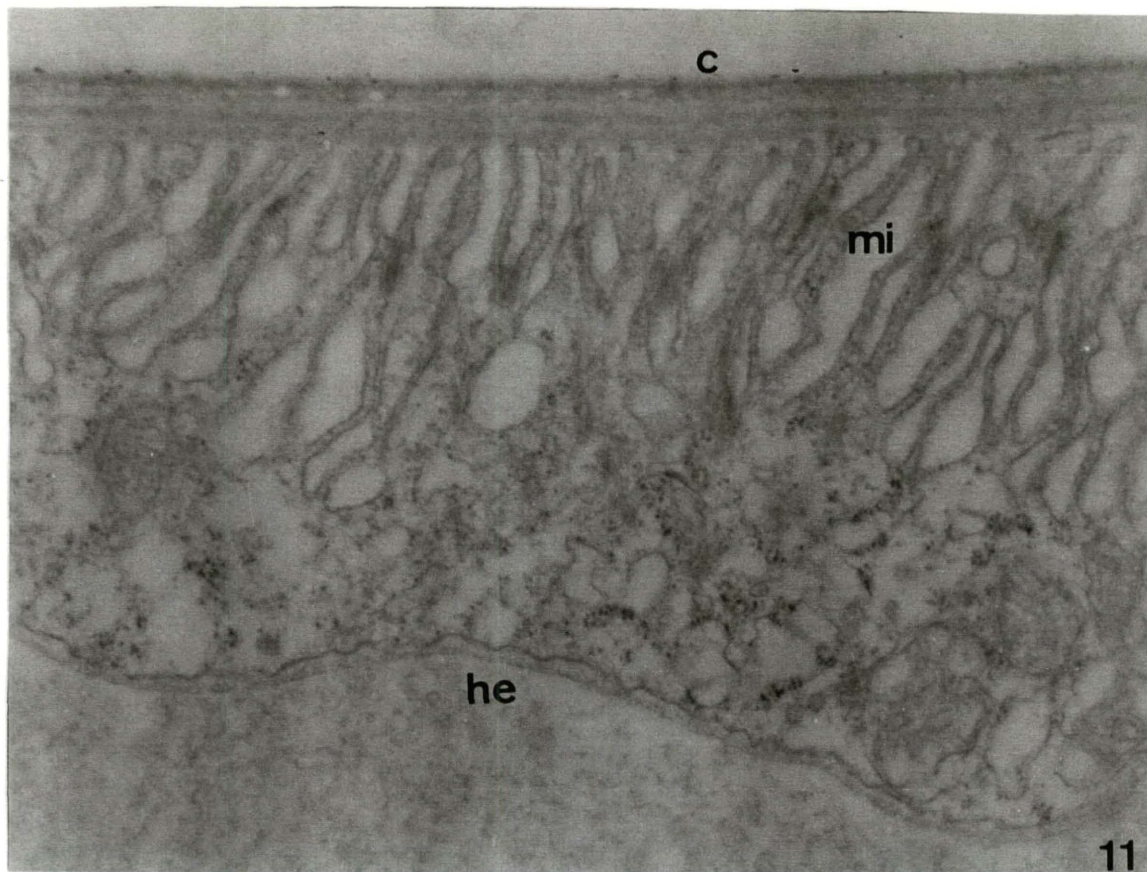


Figura 11 - *Macrobrachium acanthurus* em água 28 ‰. Região apical da célula pilar com sistema de microvilos (mi). Cutícula (c); espaço de hemolinfa (he). Aumento: 36.000X.

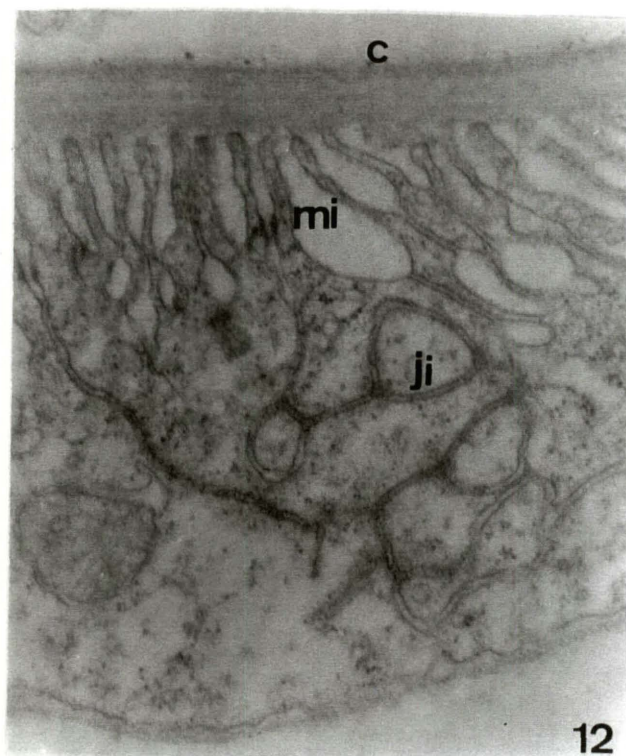
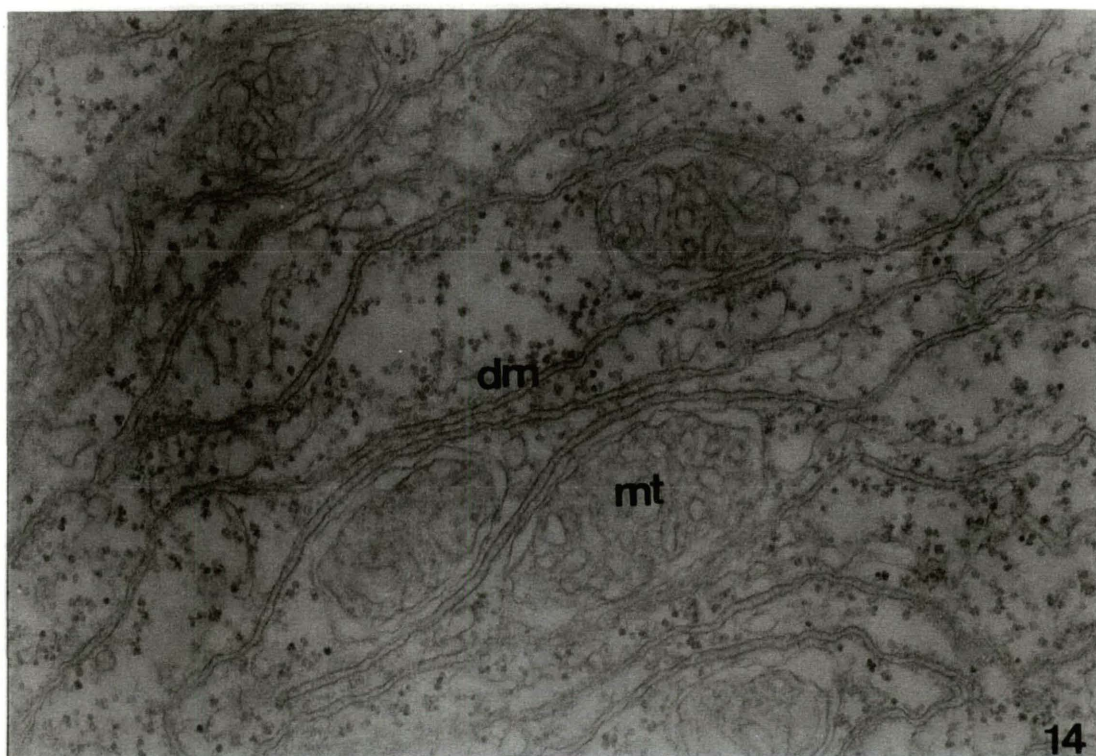
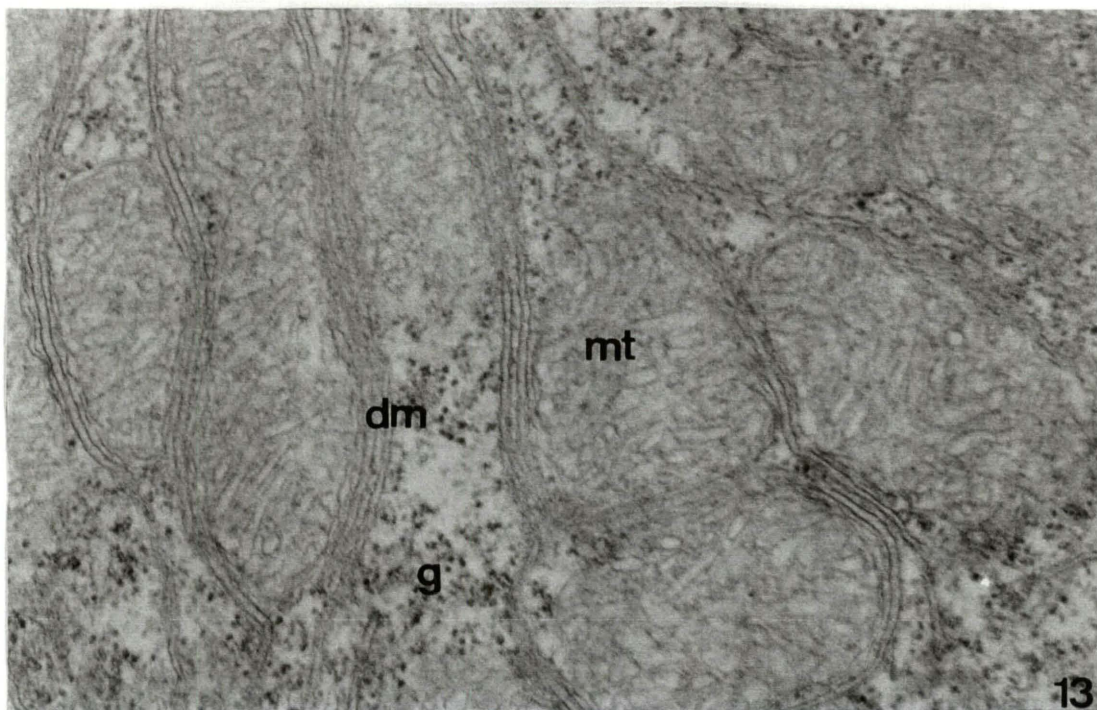


Figura 12 - *Macrobrachium acanthurus* em água 28 ‰. Região apical mostrando complexo juncional entre células adjacentes. Cutícula (c); microvilos (mi); junções intercelulares (ji). Aumento: 39.000X.



Figuras 13 e 14 - *Macrobrachium acanthurus* em água 28 ‰. Região do septo intralamelar mostrando mitocôndrias (mt), dobramentos de membrana (dm) e grânulos de glicogênio (g). Aumento: 36.000X.